

ヤーコンの茎頂培養, 節培養及びカルス培養 による増殖

松原幸子・大森 誉一^{a)}・高田裕子^{a)}・小正富知美^{a)}
深沢広祐^{b)}

(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Received July 1, 1990

Vegetative Propagation of Yacon by Shoot Apex, Node and Callus Cultures

Sachiko MATSUBARA, Yoichi OHMORI^{a)}, Yuko TAKADA^{a)}, Tomomi KOMASADOMI^{a)}
and Hirosuke FUKAZAWA^{b)}

(Division of Biological Function and Genetic Resources Science)

Vegetative propagation of Yacon (*Polymnia sonchifolia*), a tuberous plant, was studied by shoot apex, stem node and callus cultures.

Apex culture : Shoot apices of 0.3~0.5 mm were planted on MS medium containing 0.01 mg/l NAA and BA, and they grew plants after one month culture. Plants were acclimatized on vermiculite.

Stem node culture : Stems of sterile plants obtained from apex culture were cut into each node, and nodes detached leaves were planted on four kinds of media ; MS medium with or without 0.01 mg/l NAA and BA, and Hyponex (1 g/liter water) with or without 0.01 mg/l NAA and BA. Nodes were grouped into distal and proximal halves. About two shoots grew from each node, i. e. large one and small ones. Nodes of distal half grew more vigorously than that of proximal half, and vigorous growth was obtained on both of MS and Hyponex media without phytohormones.

Callus culture : Leaf, stem and root explants were planted on sixteen kinds of MS media containing 2,4-D and BA of various concentrations. Leaf and stem explants formed bigger calli than that of root explant. The biggest callus was obtained on MS medium containing 0.1 mg/l 2,4-D and BA. Callus was proliferated by transferring to MS medium containing 0.1 mg/l 2,4-D and 1 mg/l BA, and adventitious embryos were regenerated at low rate by transferring to MS medium containing 0.1 mg/l BA. These embryos grew into plants by transferring to MS medium.

緒 言

ここ数年来名前を聞くようになったヤーコン (*Polymnia sonchifolia*) は、南米原産のキク科の多年性球根植物でニュージーランドから1985年日本へ導入された^{1,2)}。根菜として生又は調理して食べられ、サツマイモ、レンコン、ダイコンをミックスしたような、また人によってはナシの味を感じる、と報告されているこれからの野菜である。また消化吸収されにくい天然の甘味物質であるフラクトオリゴ糖を多量に含むので機能性食品としても注目されて

a) 神戸女子大学バイオテクノロジー研究センター (Kobe Women's University, Biotechnology Research Center)

b) 神戸女子大学 (Kobe Women's University)

いる¹⁾。

この植物の繁殖は主に株分けによってなされていたが、最近浜田ら³⁾は節培養による増殖に成功した。彼らは 0.1 mg/l BA を添加した MS 培地に節を植え付け、苗条伸長後 1 mg/l IBA 添加培地に移植して発根させ、鹿沼土で順化させることにより 1 年間に 1 茎頂から 80,000 本の苗が生産されることを試算した。我々もヤーコンの節培養を以前から試みており、更に能率的な培地を見いだしているので報告する。またカルス培養を試みた結果についても報告する。

材 料 及 び 方 法

1) 茎 頂 培 養

岡山県赤磐郡瀬戸町の神戸女子大学セミナーハウスの圃場で栽培し、1988 年 11 月に収穫し籾殻中に貯蔵しておいた球根から発芽した苗条の頂茎および側芽の茎頂を、1989 年 4 月 1 日から 15 日の間に切り取って用いた。葉を切りはずした、茎頂を含む茎の部分を 70% エタノールで数秒、アンチホルミンで 10 分表面殺菌した後、0.3~0.5mm の茎頂を顕微鏡下で切り出し、培地に植え付けた。培地は Murashige & Skoog (1962)⁴⁾ の無機塩及び有機物に 3% ショ糖、ゲル化剤として 0.8% の寒天(以後 MS 基本培地と称する)または 0.2% の gelrite、さらに 0.01 mg/l の NAA と BA を添加した。培養は 16 時間 1,500 ルックスの人工光または暗黒条件下で行った。1 か月間培養後、15 日毎に同じ培地に移植し 16 時間日長下に置いた。出来た植物体の順化のためには、プラントボックスにパーミキュライトを入れ、植物体を植え付けた後、蓋をして 25℃ に置き、徐々に蓋をあけて外気に慣らしていった。1 週間に 1 度ハイポネックスを 1 g/l の濃度で溶かして与えた。

2) 節 培 養

茎頂培養で得た無菌の小植物体が 8~11 節を持つように生長したとき、各節毎に切り分け葉を切り捨てて、各種培地に植え付けた。このとき茎頂側の上半分と、基部側の下半分の節の 2 種類の外植体について比較した。各処理区ごとに 12 外植体を供試した。培地は、MS 基本培地又はハイポネックスを 3 g/l、蔗糖 30 g/l と寒天 8 g/l 添加培地のそれぞれに 0.01 mg/l の NAA と BA を添加したものと、ホルモン無添加の 4 種類とした。培養期間は 10 月 25, 26, 27 日に植え付け、2 か月後に発芽率や生長量を測定した。

3) カルス培養

カルス形成：茎頂培養で得た無菌植物体の根の根端及び根の基部、茎をそれぞれ 3 mm に切断し、葉は太い葉脈を含む部分、葉柄、葉脈の無い部分をそれぞれ 3 mm 平方に切断し、種々の培地に 10 外植体ずつ植え付けた。培地は基本培地に 2,4-D と BA をそれぞれ 0, 0.1, 1.0, 5.0 mg/l の濃度で添加した 16 種類とした。植え付けは 8 月 4~7 日に行い 1 か月後にカルス形成を見た。

カルス増殖及び不定胚の形成：0.1 mg/l BA と 0.1 mg/l 2,4-D を添加した基本培地上で茎頂から形成されたカルスを約 3 mm 角に切り分け、次の組成の培地に移植した。(a) BA 0.1 mg/l, (b) BA 1 mg/l, (c) 2,4-D 0.1 mg/l + BA 1 mg/l を添加した 3 種類の培地で 20 日間増殖した。それらのうち(c)培地で増殖したカルスで脆くやや紫がかった良いカルスが得られたので、それを 0, 0.1, 1.0 mg/l BA, 又は 2,4-D 0.1 mg/l + BA 1 mg/l 添加培地へ移植して 2 ヶ月間培養し、植物体の再分化を見た。

結 果

1) 茎 頂 培 養：基本培地では生長は遅いが、正常な植物となった。いっぽう gelrite 添加

区では植物体が水浸状となった。また培養条件が明条件下では正常に生長したが、暗黒条件下ではもやしようになり、さらに水浸状になった。1か月後には発根し、順化することができた。無菌の植物体は節毎に切って外植体として用いることができる。

2) 節 培 養：結果を Table 1, Fig. 1 に示した。1 節からは苗条が1～4本、平均2本伸長した。苗条は1本は大きく、その他は小さいのが1本以上伸長したので、前者をL、後者は小さい苗条全部の平均をSとして示した。いずれの培地上でもLは100%発芽し、Sは90%前後の発芽であった。発根率もLは80～100%だったのに対し、Sは苗条の10%以下であった。しかしいずれの場合も1か月以上同じ培地で培養を続けることにより、発根し植物体となった。節からの苗条生長は、いずれの培地でもLで、また基部側の節の方で良い生長を示した。培地ではMS培地の方がハイポネックス培地よりやや生長が良く、ホルモン添加の効果はなく、かえって抑制的でもあった。ホルモン添加MS培地では切口にカルス形成が見られる場合があり、ホルモンフリーのハイポネックス培地でも僅かにカルスが見られた。伸長した植物体は、いずれも1)と同様な方法によって順化できた。

3) カルス培養

カルス形成：葉、茎、根の切片から形成されたカルスの平均生体重と、T検定による5%レベルで有意差のある処理区について、それぞれ Table 2, 3, 4 に示した。葉片からのカルス形成は (Table 2, Fig. 2), 2,4-D と BA をそれぞれ 0.1 mg/l の濃度で添加した培地 (6 区) で他区と有意差があり、一番大きなカルスとなった。一方 2,4-D と BA がそれぞれ 1 mg/l 以上になると逆に小さなカルスとなった。茎切片か

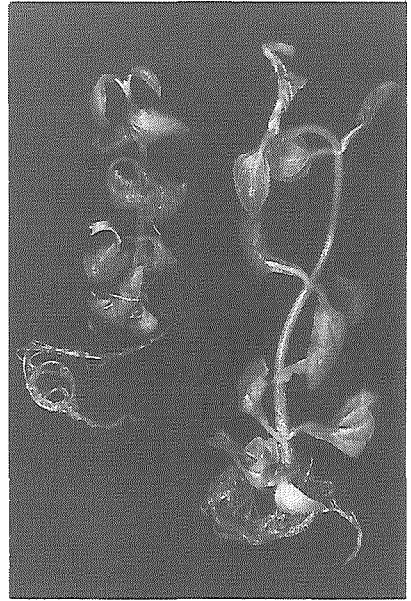


Fig. 1 Plants grown from one node. Left ; small plant (S), Right ; large plant (L).

Table 1 Effects of media and ages of node explants on plant growth

Medium	Position of node*	Size of shoot**	Sprouting percent	Rooting percent	Plant height (mm)	No. of leaves	No. of nodes	No. of roots	Longest root length(mm)	No. of plants / node
MS	(DH)	L	100	92	47.2	13.0	6.6	2.6	106.1	2.2
		S	92	14	4.3	2.6	1.4	1.5	4.4	
	(MH)	L	100	92	86.8	20.1	8.3	3.2	146.4	2.0
		S	100	8	4.7	5.9	2.7	1.0	12.3	
MS+NAA***+BA***	(DH)	L	92	42	35.0	12.4	7.1	2.6	86.6	2.1
		S	67	31	11.4	8.2	4.2	1.8	38.6	
	(MH)	L	100	92	81.5	20.2	9.1	3.2	147.1	2.2
		S	100	8	4.5	4.1	2.1	3.0	39.0	
Hyponex	(DH)	L	100	82	39.8	12.6	6.3	1.6	98.5	2.1
		S	91	8	4.0	3.3	1.7	1.0	13.0	
	(MH)	L	100	100	95.9	17.9	9.3	2.3	194.5	1.9
		S	92	0	2.6	3.6	1.7	0.	0	
Hyponex+NAA+BA	(DH)	L	100	100	52.1	14.0	6.9	1.4	130.3	2.0
		S	91	0	3.3	2.4	1.4	0.	0	
	(MH)	L	100	83	55.7	16.0	7.8	2.9	132.2	2.1
		S	100	8	4.3	4.7	2.3	1.0	2.0	

* DH: Distal half, MH: Maximal half.

** See text.

*** 0.01 mg/l NAA and BA were supplied in the medium.

らは (Table 3, Fig. 2), 6, 10 および 14 区のように平均値は大きかったにもかかわらず, ばらつきが大きい他区との間に有意差が見られない区があったが, 2, 4-D, BA とも 1 mg/l の 11 区, 5 mg/l BA と 1 mg/l 2, 4-D の 15 区では生体重が重い区として有意差が見られた. 根切片からは (Table 4), 6 区で非常に重いカルスができ, かつ他区との間に有意差も見られた. 一方 2, 4-D が 1 mg/l 以上の培地でカルス形成が非常に悪かった. 以上 2, 4-D, BA とも 0.1 mg/l 添加の 6 区で大きなカルスが形成された. この 6 区について外植体の間の有意差を t-テストで見てみると, 葉と根の間では $t=2.501$ となり 5% レベルで有意差が見られ, 葉を外植体とし, 6 の培地に植え付けるのが一番良いことになるが, 葉と茎の間では $t=0.479$

Table 2 Callus fresh weight from leaf explant on various media and T-test between two means

Medium no.	Phytohormones (mg/l)		Mean fresh weight (mg)	Medium no. with significant differences ($p<0.05$) (T-test)			
	BA	2, 4-D					
1	0	0	59.5	3,	6, 7,	10, 11,	14, 15
2	0	0.1	285.9		6,	10,	
3	0	1.0	115.7	4, 5,	6, 7, 8,	10, 11,	13, 14, 15, 16
4	0	5.0	50.1		6, 7,	10,	12, 13, 14, 15
5	0.1	0	61.5		6, 7,	10, 11, 12, 13, 14, 15	
6	0.1	0.1	2309.0		7, 8, 9,	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	
7	0.1	1.0	187.8		8, 9,		
8	0.1	5.0	18.8			10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	
9	1.0	0	56.6			10, 11,	14, 15
10	1.0	0.1	106.4			11, 12, 13, 14, 15, 16	
11	1.0	1.0	112.7			12, 13,	16
12	1.0	5.0	31.8			13, 14, 15	
13	5.0	0	12.7				14, 15, 16
14	5.0	0.1	75.7				16
15	5.0	1.0	65.4				16
16	5.0	5.0	24.4				

Table 3 Callus fresh weight from stem explant on various media and T-test between two means

Medium no.	Phytohormones (mg/l)		Mean fresh weight (mg)	Medium no. with significant differences ($p<0.05$) (T-test)			
	BA	2, 4-D					
1	0	0	74.2		11,		15
2	0	0.1	239.1				
3	0	1.0	93.7		11,		15
4	0	5.0	24.7	7,	11,	13,	15, 16
5	0.1	0	407.2				15
6	0.1	0.1	3115.4				
7	0.1	1.0	157.9		11, 12,		15
8	0.1	5.0	144.4		11,		15
9	1.0	0	174.9		11,		15
10	1.0	0.1	2275.1				
11	1.0	1.0	892.2			12, 13,	16
12	1.0	5.0	47.4				15, 16
13	5.0	0	82.0				15
14	5.0	0.1	1072.1				
15	5.0	1.0	2196.1				16
16	5.0	5.0	163.6				

となり有意差は見られない。カルスのその後の再分化能についてはここでは見ていないが、そのまま培地において置くといずれの区でも発根が見られた。

カルス増殖及び不定胚の再分化：いずれの区でも継代培養でカルスの増殖が著しく、それからホルモンフリー又は 0.1 mg/l BA 添加培地に移植したもので多くのグリーンスポットが形成され、特に後者の培地では僅かの不定胚の形成が認められた (Fig. 3)。これをさらに 1 か月以上培養することにより、植物体にまで生長させることができた。

考 察

茎頂培養に関しては非常に簡単であるが、1 茎頂より 1 植物体しか得られないのでウイルスフリー植物を育成するためにこの技術を使うべきであろう。一方浜田ら³⁾も述べているように節培養は簡単に、しかも能率よく (年間 1 茎頂より 2.6 ~ 8 万本) 増殖可能であるのでより実用的である。ただ彼らの方法では培地も MS に BA 添加、無添加の 2 種類のみで BA 0.1 mg/l 添加区での生長がよいことを述べているが、生長量が本試験に比較して低い。節の位置による差を見ておらず、全部の平均での生長量の故であろう。培地は、MS に限らず肥料

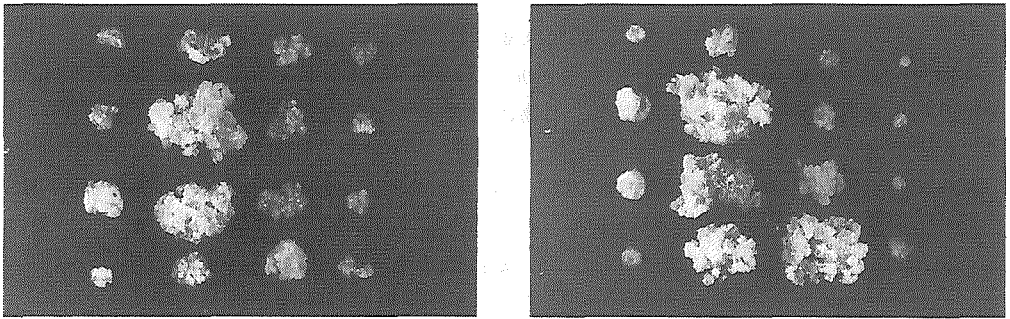


Fig. 2 Callus formation from leaf explant with vine (left) and stem explant (right) cultured on MS medium containing 2,4-D and BA. Concentrations are as follows ; 2,4-D : 0, 0.1, 1 and 5 mg/l (from left column to right column) and BA : 0, 0.1, 1 and 5 mg/l (from upper row to lower row).

Table 4 Callus fresh weight from root explant on various media and T-test between two means

Medium no.	Phytohormones (mg/l)		Mean fresh weight (mg)	Medium with significant differences ($p < 0.05$) (T-test)			
	BA	2,4-D					
1	0	0	23.6	2, 3, 4,	6,	8,	11, 12,
2	0	0.1	168.0	3, 4, 5,	6, 7, 8, 9,		11, 12, 13,
3	0	1.0	35.8	4,	6,	8,	11, 12,
4	0	5.0	2.6		5, 6, 7,	9,	11, 12, 13
5	0.1	0	26.2		6,	8,	11, 12,
6	0.1	0.1	1584.0			7, 8, 9, 10,	11, 12, 13, 14,
7	0.1	1.0	31.1			8,	11, 12,
8	0.1	5.0	2.4			9,	12, 13
9	1.0	0	43.6				11, 12
10	1.0	0.1	115.1				
11	1.0	1.0	0.7				13,
12	1.0	5.0	0.6				13,
13	5.0	0	21.0				
14	5.0	0.1	127.9				
15	5.0	1.0	10.3				
16	5.0	5.0	3.8				

として使われているハイポネックスでも十分であり、また植物ホルモンはかえって抑制的に働くことを見ると、非常に増殖しやすい植物であり、更に簡単に増殖が可能であると思われる。

一方カルスからの植物体再分化はこれまでの培地では再分化が困難で、僅かの不定胚形成が認められたのみであり、今後植物ホルモンの効果を詳しく調べなければならないであろう。しかし予備試験では長期間培養し続けることにより多くの不定芽も出て来ており、カルスからの植物体再分化の可能性は高い。

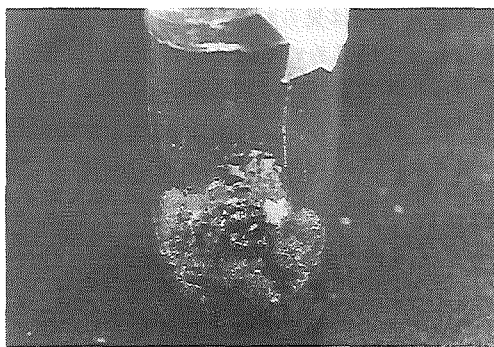


Fig. 3 Shoot grown from an adventitious embryo.

要 約

ヤーコンの無病苗の増殖のために、茎頂培養、節培養、カルス培養を試みた。

茎頂培養は、0.01 mg/l NAA と BA を添加した MS 培地に 0.3 ~ 0.5 mm の茎頂を植え付けて約 1 か月間培養することにより、植物体となった。これはパーミキュライトで順化することが可能であった。

節培養は、葉を切り捨てた無菌植物の節を 0.01 mg/l NAA 及び BA 添加又は無添加の MS 又はハイポネックス培地に植え付けることにより、節当たり約 2 苗条得ることができ、そのままの培地で培養することにより発根した。基部側の下半分の節からの苗条の生育が非常に良く、MS、ハイポネックスいずれの培地でもホルモン無添加培地でよく生育した。

カルス培養は、供試材料として無菌植物の葉、茎、根を比較したところ茎で一番大きなカルスができたが、培地によっては再現性にかける。茎のみならず葉でも根でも 0.1 mg/l 2,4-D と BA を添加した MS 培地で大きなカルスが出来た。

茎頂培養で形成された植物の茎頂を、0.1 mg/l 2,4-D と 1 mg/l BA を添加した培地に移植してカルスを形成させ、さらに 0.1 mg/l BA 添加培地に移植したところ、低率ながら不定胚が形成された。これは植物体にまで生長した。

引 用 文 献

- 1) 浅見輝男・大山卓爾・南沢 究・月橋輝男：多量のフラクトオリゴ糖を含む新しい根菜ヤーコン — 機能性食品およびフラクトオリゴ糖の原料として注目 —。農及園 64, 1033-1036 (1989)
- 2) 菅野元一：薬用植物ヤーコンの栽培。農及園 64, 538-540 (1989)
- 3) 浜田守彦・細木高志・草開康弘：節培養によるヤーコンの大量増殖。植物組織培養 7, 35-37 (1990)
- 4) Murashige, T. and F. Skoog : A revised medium for the rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 914, 473-497 (1962)